



HELICOBACTER PYLORI'NİN NEDEN OLDUĞU EPIGENETİK VE GENETİK DEĞİŞİKLİKLER VE GASTRİK KARSİNOJENEZ GELİŞİMİNDE ROLLERİ

EPIGENETIC AND GENETIC CHANGES CAUSED BY HELICOBACTER PYLORI AND THEIR ROLES IN GASTRIC CARCINOGENESIS

Didem ORAL¹, Anıl YİRÜN¹, Pınar ERKEKOĞLU^{1*}

¹Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 06100, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Helicobacter pylori* mide mukozasında kolonize olan bir bakteridir ve dünya genelinde en yaygın enfeksiyon hastalıklarından birisidir. *Helicobacter pylori*'nin gastrik kanser ve mukoza-assosiyel lenfoid doku (MALT) lenfomaya neden olduğuna dair bulgular vardır. Bu bakterinin gastrik karsinogenez gelişimindeki etki mekanizmaları ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olup, hem epigenetik hem de genetik mekanizmaların bu süreçte etkili olduğu belirtilmektedir. Bu derlemede, *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu gastrik karsinogenez sürecindeki epigenetik ve genetik mekanizmalar değerlendirilecektir.

Gereç ve Yöntem: *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu epigenetik ve genetik değişiklikler ve gastrik karsinogenez gelişimindeki rolünün tespiti için yapılan çalışmaların kapsamlı olarak derlenebilmesi için başta PUBMED olmak üzere sağlık bilimleri alanındaki veri tabanları kullanılmış ve özellikle de son on yılda bu konuda yayınlanan makalelerden yararlanılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu karsinogenezin gelişiminde kronik inflamasyonun yol açtığı oksidatif stres, bakteriyel virülans faktörleri, konakçıya bağlı intrinsik ve ekstrinsik faktörlerin bir bütün olarak tetiklediği epigenetik ve genetik mekanizmalar rol oynamaktadır. Ancak, bu *Helicobacter pylori*'nin yol açtığı tüm epigenetik ve genetik değişiklikler henüz tam olarak anlaşılmamış olup, daha fazla *in vivo* ve *in vitro* mekanistik çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, epigenetik mekanizmalar, DNA hasarı, gastrik karsinogenez

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Pınar Erkekoglu
e-mail: erkekp@yahoo.com, erkekp@hacettepe.edu.tr

Submitted/Gönderilme: 25.03.2019 **Accepted/Kabul:** 08.07.2019

ABSTRACT

Objective: *Helicobacter pylori* is a bacteria which colonizes in the gastric mucosa and it is one of the major infectious diseases throughout the world. There are findings pointing out that *Helicobacter pylori* can cause gastric cancer and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. There are several studies on the mechanism of action of this bacterium and it is indicated that both epigenetic and genetic mechanisms are effective in this process. In this review, we will evaluate epigenetic and genetic mechanisms caused by *Helicobacter pylori* through gastric carcinogenesis development.

Material and Method: In order to review the epigenetic and genetic mechanisms caused by *Helicobacter pylori* and their roles in gastric carcinogenesis development comprehensively, the health sciences databases including PUBMED were used and particularly the scientific papers on these subject published in the last ten years were used.

Result and Discussion: The epigenetic and genetic mechanisms caused by chronic inflammation (like oxidative stress, bacterial virulence factors, intrinsic and extrinsic factors) may trigger the gastric carcinogenesis development by *Helicobacter pylori* as a whole. However, all of the epigenetic and genetic alterations caused by *Helicobacter pylori* are not yet fully understood and more *in vivo* ve *in vitro* mechanistic studies are needed.

Keywords: *Helicobacter pylori*, epigenetic mechanisms, DNA damage, gastric carcinogenesis

GİRİŞ

Kanser, çeşitli protoonkogenler ve tümör süpresör genlerde meydana gelen genetik ve epigenetik değişimlerin birikimi sonucunda ortaya çıkan çok basamaklı bir süreçtir. Genetik değişimler DNA sekansında meydana gelen kromozom yapısındaki ya da sayısındaki mutasyonlarla karakterize iken, geri dönüşlü epigenetik değişimlerde gen sekansında değişim olmamaktadır ve bu değişimler geri dönüşlüdür. Epigenetik değişimler başlıca histon asetilasyonu ve DNA metilasyonundan oluşmaktadır. Kromozomal bölgeler, asetillendiklerinde ya da hipometilasyona uğradığında transkripsiyonal olarak aktive olurlarken, deasetillendiklerinde ya da hipermetilasyona uğradıklarında transkripsiyonel olarak inaktive olmaktadır. Dolayısıyla, bu değişimler kromozomal mutasyonlara yol açmaktadır [1]. Kronik inflamasyon sırasında inflamatuvar yanıtla oluşan proinflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azot türevleri (RAT)'ı kapsayan mediatörleri tümör bağlantılı çeşitli genlerde nokta mutasyonu, delesyon, duplikasyon, rekombinasyon ve metilasyon gibi çeşitli mekanizmalar aracılığı ile genetik ve epigenetik değişimleri indükleyebilirler. Tüm bunlara ek olarak, inflamasyon aynı zamanda çeşitli tümör bağlantılı mRNA veya proteinlerin üretimlerinde görevli microRNA (miRNA)'ların ekspresyonunda da etkili olabilmektedir. Kronik inflamasyonla indüklenen bu moleküler olaylar sonucunda normal hücresel fonksiyonların da dahil olduğu pek çok önemli yolak değişebilmekte ve böylece inflamasyon kaynaklı karsinogenez gelişimi hızlanabilmektedir [2].

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla virüsler, bakteriler ve parazitlerin neden olduğu kronik inflamasyonun dünya genelinde yılda 1,6 milyon inflamasyon kaynaklı kanser vakasına yol açtığı ve birçok bakteri türünün ürettiği toksinlerin kronik enfeksiyona ek olarak hücre siklusunda bozulmaya ve hücre büyümesinde değişimlere neden olduğu gösterilmiştir [3, 4]. Patojen ajanların salgıladıkları

genotoksinler ve onkoproteinler aracılığı ile de konakçı hücre genomunda mutasyona neden olabildikleri, bu proteinlerin aynı zamanda DNA onarım mekanizmalarında da değişimlere yol açtıkları bilinmektedir [5]. Son yıllarda kronik bakteriyel infeksiyonların kanser gelişimi üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmış ve birçok bakteri infeksiyonunun onkojenez üzerindeki etkisi gösterilmiştir [6]. Yapılan bu çalışmalarda birçok bakteri türünün kronik infeksiyon ya da ürettikleri toksinler yoluyla hücre siklusunun bozulmasına yol açtıkları, karsinojenik kimyasallara benzer şekilde normal hücre büyümesini etkileyebildikleri, apoptoz yolaklarında değişimlere neden olabildikleri ve farklı tiplerde DNA hasarları oluşturabildikleri belirtilmiştir. Örneğin *Salmonella typhimurium*'un mesane kanserine, *Streptococcus bovis*'in kolon kanserine ve *Chlamydia bovis*'in akciğer kanserine neden olduğuna dair bulgular mevcuttur [4,7].

Dünya genelinde en yaygın infeksiyon hastalıklarından biri olan ve dünya popülasyonunun yaklaşık %40-%50'sini infekte ettiği tahmin edilen *Helicobacter pylori*'nin ise gastrik kanser ve mukoza-assosiyel lenfoid doku (MALT) lenfomaya neden olduğuna dair kesin bulgular olup, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından "Grup I karsinojen (insanda kesin karsinojen) olarak sınıflandırıldı" bilinmektedir [4,7]. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla, *Helicobacter pylori* kronik infeksiyonunun ROT/RAT'nin oluşumunu indüklediği; bunun sonucunda gastrik kanser gelişimine neden olan oksidatif/nitrozatif DNA hasarı oluşumunda etkin rol oynadığı bildirilmiştir. Gastrik inflamasyon şiddetinin, konakçının genetik özelliklerinin ve immün cevabının, başta diyet olmak üzere çevresel faktörlerin ve bakteriye özgü faktörlerin tümünün bir bütün olarak gastrik kanser gelişimde etkili olduğu gösterilmiştir [8]. Yapılan çalışmalar *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörlerinin de gastrik kanser gelişiminde etkin rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca *Helicobacter pylori*'nin, virülans faktörlerinden ve ROT oluşumundan bağımsız olarak da genotoksik etkiye neden olduğuna dair bulgular da mevcuttur [9].

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori, yaklaşık 3 µm uzunluğunda ve 5 µm çapında gram negatif, üreaz pozitif, mikroaerofilik, heliks biçimli ve flagellalı bir bakteridir [10,11]. İki veya altı adet yaklaşık 3 µm uzunluğunda ünipolar flagellası vardır ve bu yapılar *Helicobacter pylori*'nin, gastrik mukoza içinde hareket etmesini ve kolonize olmasını sağlar. Yapılan çalışmalar mikroaerofilik olan *Helicobacter pylori*'nin optimal yaşama koşullarının yüksek nemli ortamda, pH 5,5-8'de, %2-%5 oksijen ve %5-%10 karbon dioksit seviyelerinde olduğunu göstermiştir [12]. Düşük parsiyel oksijen basınçlı, yüksek konsantrasyonlarda gastrik ve sindirim enzimleri içeren gastrik mukozada kolonize olan *Helicobacter pylori*, gastrik ortamdaki pH'yı salgıladığı üreaz enzimi ile yükseltir ve ünipolar flagellası ile mide duvarı mukozasının iç tabakalarına hareket ederek ortama adapte olur [13]. *Helicobacter pylori* üreaz, katalaz, müsinaz, lipaz gibi enzimleri, nötrofil aktive edici protein (NAP), dış membran proteini (OMP)

gibi proteinleri içermesinin yanısıra, ayrıca lipopolisakkarit (LPS), vakuole edici sitotoksin A (VagA) ve sitotoksin assosiyasyon gen A (CagA) gibi birçok virülans faktörlerine de sahiptir. Bu faktörler aracılığı ile patojenik etki gösterdiği bilinmektedir [14]. Kronik gastrit, peptik ülser ve gastrik kanserlerin başlıca etkeni olan *Helicobacter pylori*'nin oral-oral ve feka-oral yolla bulaştığı gösterilmiştir [11].

Gastrik kanserler dünya genelinde kanser nedenli ölümlerinde ikinci sırada yer almakta olup, her yıl yaklaşık 1 milyon yeni tanı ile ve gene yılda yaklaşık 750.000 ölümlü vaka ile sonuçlanmaktadır. Gastrik kanserler çok faktörlü bir hastalık olup risk faktörleri arasında çevresel faktörler, genetik faktörler ve patojen-konakçı ilişkisi yer almaktadır. Ayrıca tüm bu parametrelerin bir arada olduğu çoklu faktörler de hastalığa yol açabilir. Gastrik kanserler Doğu Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya gibi gelişmekte olan ülkelerde dünya genelindeki vakaların 2/3'nü kapsamakta olup, bu vakaların %42'sinin Çin'de görüldüğü bildirilmiştir. Gastrik kanserler, ülkemizde kadınlarda en sık görülen 4. kanser tipidir; erkeklerde ise en sık görülen 5. kanser tipi olarak belirlenmiştir. Ülkemizde kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında akciğer, meme, lenf ve kan doku kanserlerini takiben gastrik kanserler 4.sırada yer alırken; erkeklerde kansere bağlı ölümler arasında akciğer kanserini takiben 2. sırada yer almaktadır. Türkiye'de mide kanserinin erkeklerde insidansı 12,9/100000; kadınlarda ise 6,8/100,000'dir [6,15, 16]. Gastrik kanserlerin ve MALT lenfomaların zemininde uzun süreli kronik gastrik inflamasyonun yatmakta olduğu bilinmektedir. Gastrik kanser gastrit, atropik gastrit, intestinal metaplazi ve displazi ve sonrasında diffüz veya intestinal tip gastrik karsinoma şeklinde bir seyir gösterebilmektedir [17]. *Helicobacter pylori* gastrik kolonizasyonu genel olarak asemptomatiktir. *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu gastrik mukoza hasarında doğrudan veya dolaylı olarak pek çok faktör rol oynamaktadır. Konağın inflamatuvar cevabı, üreaz ya da VacA gibi spesifik virülans faktörler gastrik epitelial hücrelerde hasara ve gastrik mukosal bariyerin bozulmasına neden olmaktadır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu sonucu gastrik karsinogenезin oluşumuna yol açan etmenler Şekil 1'de gösterilmiştir.

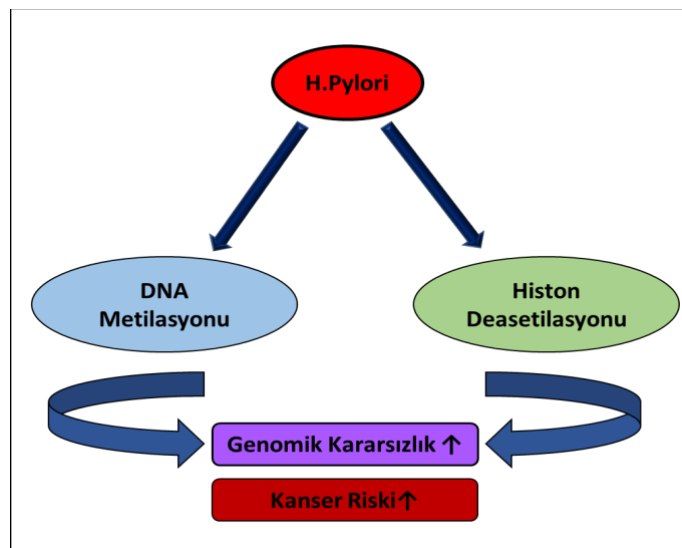


Şekil 1. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu sonucu gastrik karsinogenезin oluşumuna yol açan etmenler

Helicobacter pylori'nin insanda kronik gastrit, peptik ülser ve adenokarsinoma gibi çeşitli patolojilere yol açma mekanizmaları ile ilgili uzun yıllardır çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma yapılmış ve pek çok bulgu elde edilmiştir [18]. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ve adenokarsinoma arasındaki neden-sonuç ilişkisini gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan elde edilen veriler *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun DNA hasarına ve mutasyona yol açmasının yanı sıra DNA onarımını da inhibe edebildiğini göstermiştir [19].

***Helicobacter pylori*'nin gastrik karsinojenez gelişiminde yol açtığı epigenetik değişikliklerle ilgili yapılan çalışmalar**

Helicobacter pylori enfeksiyonu ile başlayan inflamatuvar sürece bakteriyel faktörlerle aktive edilen nötrofiller, makrofajlar ve gastrik epitelyal hücreler tarafından oluşturulan ROT ve NOS'un eşlik etmesi sonucunda, 8-oksodeaoksiguanozin (8-oxodG)/8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) gibi DNA baz hasarlarının oluştuğu gösterilmiştir [20]. *Helicobacter pylori*'nin midedeki kolonizasyonu gastrik mukozada dirençli ve aktif inflamatuvar yanıtı neden olmakta ve inflamasyon ürünlerinin indüklediği ROT ve 8-OHdG birikimi de dahil olmak üzere, mutajenik DNA hasarları gastrik karsinojenez gelişimini tetiklemektedir [21]. Yapılan çalışmalarda gastrik yüzeyle ve foveolar epitelyal hücrelerle doğrudan temasta olan *Helicobacter pylori*'nin bakteriyel ürünleri aracılığıyla, hücrenin moleküler dengesini ve hücre içi moleküler çevreyi doğrudan bozabildiği ve aynı zamanda bu süreçte oluşan antibakteriyel inflamatuvar yanıtın aktive olmasıyla başta interlökin 8 (IL-8) olmak üzere sitokinlerin de bu hasarda etkin rol oynadığı gösterilmiştir [22]. Ayrıca, *Helicobacter pylori* ürünlerinin hücre siklusunu da etkileyebileceği belirlenmiştir [23]. *Helicobacter pylori*'nin gastrik karsinojenez gelişiminde etkili epigenetik etki mekanizmaları Şekil 2'de özetlenmiştir.



Şekil 2. *Helicobacter pylori*'nin gastrik karsinojenez gelişiminde epigenetik etki mekanizmaları.

Helicobacter pylori ile indüklenen gastrik karsinogenez gelişiminde sırasıyla görülen atropik gastrit, intestinal plazi, displazi ve karsinoma şeklinde gelişen mekanizmalar zincirinde öncelikle özelleşmiş pariyetal hücrelerin kaybı, gastrik epitelyal prekürsör hücre maturasyonunda ve hücre migrasyonunda kritik rol oynayan hücrelerarası iletişimin bozulması ve hücrel farklılaşmalarda meydana gelen değişimler ortaya çıkar. Takiben, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile tetiklenen sitokinler, kemokinler, serbest radikaller (ROT ve RAT), prostaglandinler, büyüme faktörleri ve matriks metalloprotenazlarının yanı sıra bakteriyel virülans faktörleri ile karsinogenezin tetiklenmesine yardımcı olur. Gastrik kanser tipleri içinde intestinal tip adenogastrik karsinoma en yaygın türdür. Gastrit, progresif intestinal metaplazi, displazi ve sonunda gastrit kansere ilerleyen histopatolojik basamaklarla ilerler [20]. Mongolian gerbiller ile yapılan bir çalışmada *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun N-metil-N-nitrozamin (MNU) ile indüklenen mide karsinogenezini artırdığı, sadece MNU verilen ve MNU+ *Helicobacter pylori* ile infekte grupların karşılaştırılması ile gösterilmiştir. Uzun süre (62 ve 72 hafta boyunca) *Helicobacter pylori*' ile infekte olan gerbillerin 2/3'ünde gastrik adenokarsinoma geliştiği gözlenmiştir. Yine benzer bir çalışmada *Helicobacter pylori* ile 24 haftalık inokulasyonun ardından gerbillerde atropik gastrit, intestinal metaplazi ve sonunda da gastrik karsinogenez gelişimi şeklinde çok adımlı bir sürecin geliştiği gösterilmiştir [24]. Bu basamaklar içinde prekanseröz basamak olarak tanımlanan intestinal metaplazi (IM), gastrik mukozanın yerini intestinal epitelyum benzeri bir morfolojik yapının alması ile dikkati çekmektedir. *Helicobacter pylori*'nin hem IM hem de gastrik kanser oluşumunda önemli etken olduğu bilinmektedir. Çoğunlukla distal gastrik antruma kolonize olan *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu inflamasyon, hücreler arası bağlantıların bozulması ve gen mutasyonlarına ek olarak özellikle tümör supresör genlerde anormal DNA metilasyonuna da yol açmaktadır. Major epigenetik değişimlerden biri olan DNA metilasyonu CpG dinükleotidi içerisindeki sitozin halkasının 5. karbonuna bir metil grubunun bağlanmasıyla meydana gelmektedir. DNA metilasyonu hücrelerin normal gelişim sürecinde meydana gelmesine rağmen CpG adacıklarının aberan metilasyonu karsinogenez sürecinde hücre büyümesini tetiklemektedir. Gastrik karsinogenezde DNA aberan metilasyonu çok sık görülmekte olup, *Helicobacter pylori* ile gelişen kronik inflamasyonunun gastrik epitelyal hücrelerde aberan metilasyona yol açtığı bilinmektedir. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma sonucunda *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun gastrik karsinogenez gelişimine neden olabilen gen promotör hipermetilasyonlarını ve belirli spesifik gen metilasyonlarını indüklediği; aynı zamanda *Helicobacter pylori* enfeksiyonu şiddetinin DNA metilasyon seviyeleri ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir [20, 25-27].

Xie ve ark. (2017)'nin *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile global DNA metilasyonu ve gastrin hücresi promotör genlerinin metilasyon seviyeleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları bir çalışmada, gastrik mukozal GES-1 hücre serisi ve gastrik kanser SGC-7901 hücre serisi ile *Helicobacter pylori* NCTC 11637 CagA+ suşu kullanılmıştır. GES-1 ve SGC-7901 hücrelerine

pcDNA3.1::cagA ve pcDNA3.1:GFP ve negatif kontrol için de PCDNA3.1/Zeo(-) transfeksiyonu yapıldıktan sonra bu hücre grupları *Helicobacter pylori* ile infekte edilerek meydana gelen gastrin mRNA transkripsiyonu, global metilasyon ve gastrin metilasyonu analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda *Helicobacter pylori* CagA+ ile infekte GES-1 ve SGC-7901 hücrelerinde genomik DNA metilasyon seviyelerinin sırasıyla %49,4 ve %18,8 oranlarında azaldığı, pcDNA3.1::cagA transfeksiyonu yapılan GES-1 ve SGC-7901 hücrelerinde genomik DNA seviyelerinin sırasıyla %17,05 ve %25,6 oranlarında azaldığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak gastrin promotör bölgelerinde tespit edilen 24 metilasyon alanlarından 9 CpG alanının metilasyon düzeylerinin de *Helicobacter pylori* CagA+ ile infekte olan ve pcDNA3.1::CagA transfeksiyonu yapılan hücrelerde kontrol hücrelerine göre önemli oranda azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre *Helicobacter pylori* CagA pozitif zincirlerinin gastrik mukozal ve gastrik kanser hücrelerinde genom metilasyonunda ve bazı CpG alanlarının gastrin promotör noktalarının metilasyonunda azalmaya neden olduğu iddia edilmiştir [26]. Ushijima ve ark.(2006)'nın yaptıkları bir çalışmada 11 *Helicobacter pylori* pozitif hastadan ve 11 *Helicobacter pylori* negatif sağlıklı gönüllüden alınan biopsi örneklerinden elde edilen 48 gendeki CpG adacıklarının promotör bölgelerindeki metilasyon oluşumları incelenmiştir. Her iki grupta 10 gende metilasyon meydana gelmez iken, kalan 38 gende *Helicobacter pylori* pozitif olan grupta yaygın olarak metilasyon meydana geldiği tespit edilmiştir [28].

Helicobacter pylori infeksiyonunun neden olduğu gen metilasyonu ile ilgili başka bir çalışmada, infeksiyonunun E-cadherin genine olan etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada 35 gastrik biopsi örneğinden 8 normal mukoza, 21 intestinal metaplazi, 26 primer adenokarsinoma ve 32 metastatik lenf nodu DNA örneği çalışılmıştır. Örnekler metilasyona spesifik PCR analiz yönetimi ile değerlendirilmiştir. *Helicobacter pylori* pozitif hastalarının %53'ünde E-cadherin metilasyonu tespit edilirken *Helicobacter pylori* negatif olan hastalarında %94 oranında E-cadherin metilasyonu negatif olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler sonucunda, intestinal metaplazisi (IM) olan, primer ya da metastatik kanserli hatta metaplazisi ya da displazisi olmayan; ancak *Helicobacter pylori* pozitif olan hastalarda E-cadherin metilasyonunun meydana geldiği tespit edilmiş ve yapılan çeşitli analizler sonucunda *Helicobacter pylori*'nin E-cadherin metilasyonu için en önemli faktör olduğu düşünülmüştür. Bu veriler doğrultusunda, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun nükleer faktör kapp B (NF-κB) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) gibi inflamatuvar mediyatörler aracılığıyla transkripsiyonal aktivasyonu indükleyebileceği iddia edilmiştir [28,29]. Gastrik karsinogenez gelişiminde *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörleri (VagA ve CagA) tek başlarına etkindir; ayrıca, *Helicobacter pylori* kronik infeksiyonunun tetiklediği mediyatörlerin de indükte sitidin deaminaz (AID) aracılığıyla NF-κB aberran ekspresyonunu tetiklerler. Passenger genlerin CpG adacıklarında oluşan metilasyon ve *Helicobacter pylori* infeksiyonu arasındaki ilişki üzerine yapılan kantitatif metilasyon analizleri, gastrik mukozadaki yüksek metilasyon seviyeleri

ile *Helicobacter pylori* infeksiyonu arasında bağlantı olduğunu ve *Helicobacter pylori*'nin eredikasyonu ile bu metilasyon düzeylerinin azaldığını göstermektedir [30].

Maekita ve ark. (2006) *Helicobacter pylori* ve DNA metilasyon düzeyleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, *Helicobacter pylori* pozitif ve *Helicobacter pylori* negatif sağlıklı gönüllülerden aldıkları biopsi örneklerinde çoklu CpG adacıklarındaki ve bu alanlardaki metilasyon düzeylerini ölçmüşlerdir. Ayrıca, gastrik kanser gelişiminde aberran DNA metilasyonunun bir risk oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amacıyla da normal gastrik mukoza, gastrik kanserli ancak nonkanseroz gastrik mukoza bölgelerinden alınan biopsi örneklerinde metilasyon düzeylerini belirlenmişlerdir. Bu amaçla, metilasyona dirençli ancak susturucu gen olan p16'nın promotör CpG adacıklarında 2 bölge ve metilasyona hassas ancak tümör supresör gen ekspresyonu özelliğinde olmayan 8 gen bölgesi [liyizil oksidaz (LOX), filamin (FLNc), HRAS benzeri supresör (HRASLS), kalp ve nöral krest derivesi ekspresör 1 (HAND1), trombomodülin (THBD) ve aktin ilişkili protein 2/3 kompleks subünite 1B (p14ARF)] metilasyona özgü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda midenin *corpus* bölgesinden alınan biopsi örneklerinde *Helicobacter pylori* pozitif olan grupta metilasyon seviyelerinin *Helicobacter pylori* negatif gruba göre, p16 geninin CpG adacıklarında belirlenen bölgesinde yaklaşık 303 kat; diğer gen bölgelerinde ise ortalama 17 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, midenin antrum bölgesinden alınan biopsi örneklerinde p16 geninin CpG adacıklarındaki ilgili bölgesindeki metilasyon düzeylerinin 54 kat; diğer gen bölgelerinde ise ortalama 16 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda *Helicobacter pylori* infeksiyonunun CpG adacıklarının ilgili bölgelerinde değişen oranlarda metilasyonu indüklediği ve bununla birlikte gastrik karsinogenez gelişimine predispozan olduğu iddia edilmiştir [32].

Huang ve ark. (2018)'nin yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada *Helicobacter pylori* ile enfekte gastrik epitelyum biopsi örneklerinde IM gelişimine neden olan subklonal mutasyonlar ve DNA metilasyon değişimleri gösterilmiştir. IM'li belirli örneklerde çok sık olmamakla birlikte klonal mutasyonlara da rastlanmıştır. Yapılan bu çalışmada *Helicobacter pylori* ile enfekte normal gastrik epitelyal hücrelerde subklonal TP53 mutasyonları ve fokal promotör hipermetilasyonlar tespit edilirken, *Helicobacter pylori* ile enfekte intestinal metaplazi örneklerinde klonal F-kutusu/WD tekrar içeren protein 7 (FBXW7) ve nadiren kromozom 8q amplifikasyonu [MYC protoonkogeni (MYC) dahil], telomeraz kısalması ve fokal promotör hipermetilasyonlar tespit edilmiştir [33]. Yao ve ark.'nın yaptıkları bir benzer bir çalışma ile *Helicobacter pylori* infeksiyonunun IM'den kanser oluşumuna kadar uzanan gastrik karsinogenez sürecinde hMHI'de dahil olmak üzere çeşitli genlerin promotör bölgelerinin CpG adacıklarında meydana gelen metilasyonda etkin rol oynadığı belirtilmiştir [34].

Helicobacter pylori infeksiyonunun DNA metilasyonuna neden olduğuna dair gastrik biopsi örnekleriyle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler hayvan deneyleri ile de desteklenmiştir. Niwa ve ark. (2010)'nin Moğol gerbillerle yaptıkları bir çalışmada, *Helicobacter pylori* infeksiyonu sonrasında

gastrik mukozada oluşan aberan DNA metilasyonunun geçici ve kalıcı bileşenlerden oluştuğu ve bu oluşumların *Helicobacter pylori* bakterisinden çok oluşan infeksiyonla bağlantılı inflamatuvar yanıtta kaynaklandığı iddia edilmiştir. Bu çalışmada, deney grupları olarak N-metil-N-nitrozüre (MNU) ve N-metil-N-nitrozüre ile indüklenmiş moğol gerbil gastrik kanser hücre serileri (MGC1 ve MGC2); gastrik kanser oluşturmak amacıyla içme suyu yoluyla MNU verilen ve sonrasında da MNU ile inoküle edilen erkek moğol gerbil grubu; *Helicobacter pylori* pozitif insan gastrik biyopsileri; *Helicobacter pylori* negatif insan gastrik biopsi örneği ve 14 gastrik kanser biopsi örneği kullanılmıştır. Tüm örnekler kantitatif PCR ile değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, gerbil gastrik kanser hücre serilerinin CpG adacıklarında aberan metilasyon meydana geldiği ve *Helicobacter pylori* ile infekte edilen grupta 10 adacık bölgesinin spesifik olarak metillendiği gösterilmiştir. Maruziyet süresinin etkisinin araştırılması amacıyla artan inkübasyon sürelerinde *Helicobacter pylori* ile infekte edilen örneklerle yapılan analizlerde infeksiyonu takip eden 5. haftadan 10. haftaya kadar olan sürede metilasyon düzeylerinin artmaya başladığı ve 50. haftada en yüksek düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. Sonrasında, *Helicobacter pylori* ile infekte gruba bakteriyel kolonizasyonu etkilemeyen bir immünsupresan olan siklosporin A verildiğinde metilasyon düzeylerinin 10. ile 20. haftadan sonra dikkat çekici oranda düştüğü; ancak *Helicobacter pylori* ile enfekte olmayan gerbillerle kıyaslandığında daha yüksek oranlarda metilasyonun görüldüğü belirlenmiştir. Bu verilerin sonucunda *Helicobacter pylori*'nin ciddi infeksiyona yol açtığı ve bu infeksiyonun gastrik kanser riskini artıran metilasyon düzeylerinde artışa ve birikime neden olduğu öne sürülmüştür [35].

Epigenetik değişikliklerden biri olan histon modifikasyonu kısaca nükleozomları meydana getiren histonlarda çeşitli etkenlerle indüklenen metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon gibi değişimlerdir. Histon modifikasyonları sonucunda oluşan gen regülasyonu, DNA onarımı ve hücre büyümesindeki değişimler doğumsal kusurlara yol açabileceği gibi, yaşlanmadan kanser gelişimine kadar geniş spekturumda etkilere neden olabilir [36]. Xia ve ark. (2008)'nin NCI-N87 ve primer gastrik hücrelerde yaptıkları bir çalışma ile *Helicobacter pylori*'nin hücre siklusunda görevli p21^{WAF1} proteininin ekspresyonunu upregüle ettiği; artan p21^{WAF1} ekspresyonunun ise gastrik kanser gelişiminde etkin rol oynayan histon deasetilaz 1 (HDAC1)'in artışına ve histon 4 (H4)'ün hiperasetilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir [37]. Fehri ve ark.'nin yaptıkları bir başka çalışmada ise, gastrik epitelyal hücrelerinde *Helicobacter pylori*'nin histon 3 (H3) fosforilasyonunu bakterinin tip IV salgı sistemi (T4SS) virülans faktörüne bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada gastrik mukoza hücreleri MOI100 dozunda *Helicobacter pylori* sitotoksin assosiye gen A (CagA) pozitif ve vaküole edici toksin A (VacA) pozitif ve mutant *Helicobacter pylori* (VacA negatif ve CagA negatif) suşları ile infekte edilmiştir. Uygulamalar sonrasında hücrelerdeki histon fosforilasyonu düzeyleri Western blot tekniği ile değerlendirildiğinde, CagA pozitif ve VacA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte hücrelerde H3Ser10 fosforilasyonunda belirgin azalma tespit edilirken, mutant *Helicobacter pylori* suşları ile

infekte edilen hücrelerde H3Ser10 fosforilasyonunda herhangi bir azalma görülmemiştir [38]. Ding ve ark. (2010)'nın yaptıkları benzer bir çalışmada, AGS, fare fibroblast hücreleri ve MKN45 hücre serisi kullanılarak 12 ile 144 saat arası artan sürelerde *Helicobacter pylori* (CagA pozitif ve VacA pozitif) ve mutant *Helicobacter pylori* suşlarıyla infekte edilmiş ve sonrasında örnekler Western blot ve PCR ile değerlendirilmiştir. *Helicobacter pylori* ile infekte AGS ve MKN45 hücre gruplarında ve biopsi örneklerinde H3See10 defosforilasyonunda maruziyet süresine bağlı olarak artış olduğu ve ayrıca *Helicobacter pylori* (CagA pozitif) ile infekte gruplarda en yüksek artışın meydana geldiği tespit edilmiştir [39].

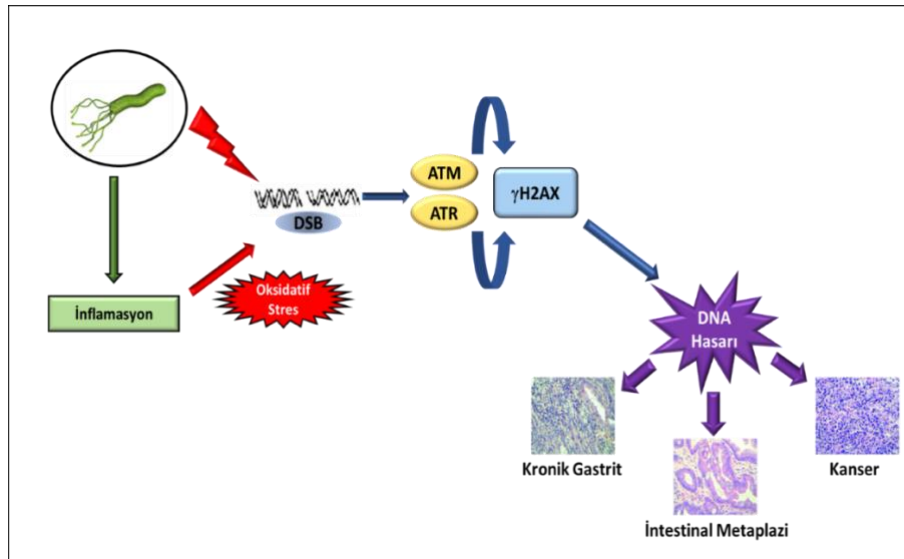
Helicobacter pylori karsinogenez gelişiminde konakçı hücre kromatini modifikasyonu ile özellikle DNA onarımını etkileyebilmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Santos ve ark. (2018) *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun virulans faktörlerine de bağlı olarak H3 ve H4 histon hiperasetilasyonu ve promotor bölgelerinin hipometilasyonu yoluyla serin/treonin protein kinaz (ATM) regülasyonunda dolayısıyla DNA hasarı onarımında epigenetik değişimlere yol açtığı gösterilmiştir. Bu çalışmada AGS ve HGC27 hücre hatlarının 4 saat boyunca *Helicobacter pylori* virülan tip (cagPAI pozitif, VacA pozitif; s1m1) ve *Helicobacter pylori* mutant tip suşları ile enfekte edilmesi sonucunda meydana gelen epigenetik değişiklikler immünofloresans boyama ve moleküler metodlarla gösterilmiştir. *Helicobacter pylori* ile enfeksiyonun neden olduğu genotoksik stres ile oluşan DNA hasar immünofloresans metotla incelenmiş ve hücre çekirdeklerinde özellikle virülan *Helicobacter pylori* ile enfekte hücrelerde kontrol grubuna göre fosforile histon 2 varyantı X (γ -H2AX) odaklarında anlamlı oranda artış tespit edilmiştir. *Helicobacter pylori*'nin indüklediği DNA hasarı ve ATM aktivasyonu arasındaki ilişkinin tespiti amacıyla, ATM mRNA düzeyleri kantitatif PCR ile ölçüldüğünde ATM mRNA düzeylerinin virülan *Helicobacter pylori* suşu ile infekte AGS ve HGC27 hücre gruplarında artış gösterdiği, enfeksiyon sonucunda H3 ve H4 histonlarında yüksek oran oranda asetilasyon meydana geldiği ve bunun sonucunda da ATM promotor bölgesinde ekspresyon artışı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Helicobacter pylori*'nin DNA çift sarmal kırıkları (DSB)'nin oluşumunu tetiklediği ve ardından DNA hasar yanıtı olarak ATM aktivasyonuna yol açtığı belirtilmiştir [40].

***Helicobacter pylori*'nin gastrik karsinogenez gelişiminde yol açtığı genetik değişikliklerle ilgili yapılan çalışmalar**

DNA'da görülen en ciddi hasarlar DSB'ler olup; çoğunlukla ionize radyasyon, ultraviyole ışınlar ve bazı kimyasal ajanlara maruziyet sonucunda meydana gelmektedir [41]. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun epitelyal ve mezenşimal hücrelerde DSB'lere yol açarak ATM, ataksi telenjiyektazi ve Rad3-ilşikili protein (ATR) ve kontrol noktası kinaz 2 (CHK2) hücre siklusu kontrol proteinlerini ve dolayısıyla γ -H2AX birikimini tetiklediği; bu yolla gastrik karsinogenez gelişiminde en önemli etkenler

olan genetik instabilite ve kromozomal aberasyonlara neden olduğu yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir [9, 42, 43].

Çift sarmal kırıklarının tespitinde en yaygın kullanılan biyogösterge γ -H2AX kullanılan bir belirteçtir ve γ -H2Ax'in aşırı ekspresyonu gastrik kanserlerin gelişimi ve prognozu ile korelasyon göstermekte olup, *Helicobacter pylori*'nin indüklediği gastrik karsinogenezin başlangıç dönemlerinde belirgin artış göstermektedir. *Helicobacter pylori*'nin indüklediği gastrik karsinogenez gelişimi ile γ -H2AX ekspresyon düzeylerini arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla Xie ve ark. (2014)'nin yaptıkları epidemiyolojik bir çalışmada 56 kronik gastritli, 53 IM'li, 47 displazili ve 146 gastrik kanser olan (toplam *Helicobacter pylori* pozitif 312 hasta) alınan gastrik biopsi örneğinde γ -H2AX ekspresyonu immünohistokimyasal boyama ile ve Western blot ile incelenmiştir. İmmünohistokimyasal boyamalar sonucunda tüm gruplarda γ -H2AX'in epitelial hücrelerin çekirdeklerinde biriktiği ve bu birikimin kronik gastritten gastrik kansere doğru artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan yarı-kantitatif analizlerde ise, normal gastrik biopsi örnekleriyle karşılaştırıldığında immünohistokimyasal bulgulara paralel olarak γ -H2AX ekspresyonu kronik gastritte %48,2; IM'de %73,5; displazide %89 ve gastrik kanserde ise %89,7 oranlarında bulunmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda, γ -H2AX ekspresyonundaki *Helicobacter pylori* infeksiyonunun kronik gastritten displaziye kadar ilerleyen süreçle korelasyon gösterdiği, gastrik kanserli hastalardan alınan biyopsilerde görülen γ -H2AX ekspresyonunun kronik gastrite göre daha yüksek oranda seyrettiği; ancak displaze göre daha düşük oranlarda seyrettiği ve bu durumun tümör progresyonu sırasında genomik instabilitenin yeniden düzenlenmesinden kaynaklanabileceği iddia edilmiştir [43].



Şekil 3. *Helicobacter pylori*'nin gastrik karsinogenez gelişiminde genetik etki mekanizmaları. DSB: DNA çift sarmal kırıkları; ATM/ATR: serin/treonin protein kinaz; γ -H2AX: fosforile histon 2 varyantı X

Helicobacter pylori'nin genotoksik etkilerinden biri de DNA hasarı onarım faktörlerine etki ederek DNA hasarında birikime yol açmasıdır. Yapılan çalışmalarla *Helicobacter pylori*'nin, DNA hasarı yanıtında görevli proteinlerin ekspresyonuna etki ettiği ve özellikle transkripsiyon alanları ile bağlantılı olan kromozom bölgelerinde bu DNA hasarlarının lokalize olarak biriktirdiği gösterilmiştir. Koepfel ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada *Helicobacter pylori* infeksiyonu sonrasında insan gastrik adenokarsinoma (AGS), MKN74 ve primer gastrik epitel hücrelerinde meydana gelen DNA hasarları ve DNA hasarı yanıtı DNA hasarı yapan çeşitli genotoksik ajanlarla (etoposid, hidroksil üre, γ -IR ve H_2O_2 gibi) karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Bunun için AGS hücreleri sırasıyla, infeksiyon çokluğu 50 (MOI50) uygulanarak *Helicobacter pylori* CagA pozitif suşu, 10 μ M etoposid, 250 mM H_2O_2 , 10 Gy γ -IR ve 10 μ M hidroksi üre ile 6 ve 18 saatlik sürelerde inkübe edilerek Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Farklı genotoksik ajan uygulanan tüm AGS gruplarında DSB'leri belirlemek için γ -H2AX indüksiyonunda ve aynı zamanda DNA hasarı yanıtı proteinlerinde artış görülürken *Helicobacter pylori* ile infekte edilen hücrelerde γ -H2AX indüksiyonu ve DNA hasar yanıtı proteinlerinde azalma görülmüştür. Ayrıca, *Helicobacter pylori* dışındaki tüm mutajenlerde ATR ve DSB onarım proteini MRE11A (MRE11) proteinlerinde fosforilasyon meydana gelirken, *Helicobacter pylori* ile infekte hücrelerde bu aktivasyonun bloke olduğu belirlenmiştir. *Helicobacter pylori*'nin aynı zamanda ATP interakte protein (ATRIP)'nin fosforilasyonunu azalttığı ve MRE11 ile birlikte MRN kompleksinin bir parçasını oluşturan nibrin kompleksi (NBS1/NBN)'nin düzeylerinde azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında *Helicobacter pylori* ile enfekte edilen hücrelere hidroksil üre de uygulanmış ve birlikte uygulama ile oluşan DNA hasar onarım proteinlerindeki azalmanın hidroksil ürenin tek başına gösterdiği etkiden daha güçlü olduğu bulunmuştur. Yapılan analizlerde *Helicobacter pylori* ve IR'nin oluşturduğu maruziyet sürelerine bağlı olarak oluşan DNA hasarı karşılaştırıldığında, AGS ve MKN74 hücrelerin *Helicobacter pylori* ile 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan γ -H2AX birikiminin 10 Gy γ -IR ile 18 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan γ -H2AX düzeylerinde olduğu bulunmuştur. *Helicobacter pylori* infeksiyonu virulans faktörleri açısından karşılaştırıldığında AGS hücrelerinde CagA pozitif suşlarının DNA hasarında ve DNA hasarı onarım yollarının inhibe edilmesinde daha potent etkiye sahip olduğu belirlenmiştir; *Helicobacter pylori* infeksiyonunun aynı zamanda MRE11 proteinin fosforilasyonuna spesifik etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca CagA pozitif suşlar ile daha baskın olmakla birlikte, tüm *Helicobacter pylori* suşlarında γ -H2Ax indüksiyonu ve DNA kırıklarının birikimi Comet deneyi ile gösterilmiştir. AGS ve MKN74 hücrelerinde *Helicobacter pylori* ile infeksiyon sonrasında DNA kırık düzeylerinin maruziyet süresine bağlı olarak arttığı; bununla beraber AGS hücrelerinde maruziyetin ilk saatlerinde kırık miktarının hızla artıp, 6- 18 saatlerde ise sabit bir düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, MKN74 hücrelerinde bu sürecin daha geç gerçekleştiği bulunmuştur. *Helicobacter pylori* ile oluşan DNA kırıklarının çoğunluğunun DSB olduğu ve DNA hasarlarının özellikle 8q kromozom bacağında biriktiği

belirlenmiştir. Çalışmada son olarak *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA onarımına olan etkisi transkripsiyonel açıdan incelenmiş ve DNA hasarı cevabında infeksiyon süresine bağlı olarak NBS1, ATR, MLH1 ve TP53 genlerinin downregüle olduğu ve *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA hasarına yol açmasının yanı sıra DNA onarım kapasitesinde de azalmaya neden olarak karsinojenez gelişiminde etkili olabileceği ifade edilmiştir [45].

DNA onarım mekanizmalarından biri olan baz ekzisyon onarımında (BER) apürinik/aprimidinik endonükleaz enzimi anahtar rol oynamaktadır. Apürinik/apirimidinik (AP) endonükleaz 1 (APE-1) ökaryot hücrelerde bulunan çeşitli DNA lezyonlarının (oksidasyon, metilasyon, deaminasyon, depürinasyon ve hidroksilasyon gibi) onarımında ve BER yolağında görev alan bir endonükleazdır. Hücre çekirdeği ve mitokondride lokalize olan APE-1 ekspresyonunun *Helicobacter pylori* infeksiyonu sonucunda azaldığı gösterilmiş; yanlış eşleşme onarımı (MMR) ve BER’de görevli genlerin downregülasyonunun gastrik kanserin başlamasında en önemli mekanizmalardan biri olabileceği belirtilmiştir [46, 47]. Ding ve ark.(2010)’nın Kato III, NCI-N87 ve AGS hücre serileri ve *Helicobacter pylori* pozitif gastrik mukoza biopsi örnekleri ile yaptıkları çalışmada, APE-1/redoks faktörü1 (Ref-1) protein ekspresyonunun *Helicobacter pylori* negatif örneklere göre anlamlı derecede arttığı gösterilmiş; APE/Ref-1 ekspresyonundaki bu artışın ve akümüülasyonun *Helicobacter pylori* virülans faktörlerinin yanısıra oksidatif stresin neden olduğu ve bu faktörlerin ve infeksiyonun H₂O₂ aşırı artışını da tetikleyebilecekleri belirtilmiştir [39].

Önemli bir baz hasarı olan 8-OHdG, *Helicobacter pylori* infeksiyonu kaynaklı ROT’un indüklediği başlıca DNA modifikasyonlarından biri olup, 8-OHdG birikimi ile *Helicobacter pylori* kaynaklı gastrit, gastrik atrofi ve IM arasında güçlü korelasyon bulunmaktadır. Ayrıca *Helicobacter pylori*, infeksiyon kaynaklı serbest radikal artışının indüklemekte ve DNA hasar yanıtında görevli DNA onarım enzimlerin sentezlenmelerine etki etmektedir. Futagami ve ark.’nın (2008) MKN-28 ve AGS hücreleriyle yaptıkları çalışmada, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun oksidatif DNA hasarın bir göstergesi olan 8-OHdG oluşumunu ve APE-1 ekspresyonunu anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada *Helicobacter pylori* ile infekte insan periferal makrofaj hücre dizisi, MKN-28 hücre serisi; 11 *Helicobacter pylori* negatif birey, 17 *Helicobacter pylori* pozitif gastrit kanser hastası ve 22 gastrik adenoma hastasından (11 *Helicobacter pylori* pozitif, 11 *Helicobacter pylori* negatif) biopsi örneği kullanılmıştır. Yapılan kantitatif PCR ve immünohistokimyasal çalışmaların sonucunda, *Helicobacter pylori*’nin makrofaj ve MKN-28 hücrelerinde APE-1 protein ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Gastrik biopsi örnekleri incelediğinde ise, yine APE-1 ekspresyonunun *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde önemli derecede arttığı ancak *Helicobacter pylori* eredikasyonu sonrasında bu oranın azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, DNA hasarında fark olmamasına rağmen, *Helicobacter pylori* pozitif ya da *Helicobacter pylori* negatif tüm gastrik kanserli dokularda APE-1 ekspresyonunun *Helicobacter pylori* pozitif gastrik adenoma örneklerine göre daha az meydana geldiği görülmüş; APE-1’in

Helicobacter pylori kaynaklı inflamatuvar ve non-neoplastik gastrik hastalıklarda önemli rol oynayabileceği ifade edilmiştir [49].

Karsinogenez gelişiminde başlıca onkogenlerin, büyüme faktörlerin ya da reseptörlerinin aşırı ekspresyonları, mutasyon ya da allelerin kaybından kaynaklanan tümör supresor gen ekspresyonunda zayıflama gibi moleküler mekanizmalara ek olarak DNA yanlış eşleşmeleri ve DNA onarım sistemindeki (örneğin, MMR) eksikliklerden kaynaklanan mutasyon birikimleri de rol oynamaktadır. MMR sistemi, başlıca MutS ve MutL proteinleri olmak üzere 2 set proteinden oluşur. MutS proteinleri insan MutS onarım proteini homolog 2 (hMSH2), insan MutS onarım proteini homolog 3 (hMSH3) ve insan MutS onarım proteini homolog 6 (hMSH6) proteinlerinden oluşurken, MutL proteinleri insan MutL homolog protein 1 (hMLH1), *Helicobacter pylori* MS1, *Helicobacter pylori* MS2 ve insan MutL homolog protein 3 (hMLH3) proteinlerinden oluşmuştur. Yapılan çalışmalarda hMLH1 ve hMSH'nin ana MMR proteinleri olduğunu ve bu proteinlerin eksikliğinde MS2, MS1 ve insan MutL homolog protein 6 (hMSH6) proteinlerinin stabilizasyonunun bozulduğu belirlenmiştir. MMR proteinleri, MutS- α (MSH2 ve MSH6) veya MutS- β kompleksi gerektirmektedir. MutS- α baz-baz yanlış eşleşmelerini, küçük insersiyonları ve delesyon loplarnı tanımlarken, MutS- β kompleksi sadece küçük insersiyon ve delesyon loplarnın tanımlanmasında görevlidir. Etkin MMR, MutS- α veya MutS- β kompleksi ile gerçekleşebilir. Mikrosatellit instabilitesi kanrsinogenez gelişiminde önemli basamaklardan biridir ve gastrik kanserlerde, mikrosatellit instabilitesinin yaygın olduğunda genellikle hMLH1 eksikliği görülürken, hMSH2 eksikliği nadirdir. Yapılan çalışmalarla aktif *Helicobacter pylori* infeksiyonu olan gastrik kanserli hastalarda mikrosatellit instabilitesinin yaygın olduğunu gösterilmiş ve *Helicobacter pylori*'nin gastrik karsinogenez gelişiminde MMR yolağında tek başına etkili olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun MMR proteinlerinden hMSH2 ve hMLH1 proteinleri üzerinde etkili olduğu ve ek olarak da diğer MMR proteinlerinde azalmaya neden olduğu da belirlenmiştir [23, 50]. Mikrosatellit instabilitesi ile *Helicobacter pylori* infeksiyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, IM bölgelerindeki mikrosatellit instabilitesinin aşırı birikiminin gastrik kanser gelişiminde önemli etken olduğu ve yine IM hastalardan alınan gastrik biopsi örneklerinde *Helicobacter pylori* infeksiyonunun oldukça yüksek oranda pozitif olduğu bildirilmiştir. Leung ve ark. (2000)'nin yaptıkları bir çalışmada, 75 IM'li hasta örneğinden alınan (30 gastrik kanser, 26 peptik ülser ve 19 kronik gastritli hasta olmak üzere) gastrik biopsi örnekleri incelendiğinde, bu hastaların %93,3'ünde *Helicobacter pylori* infeksiyonunun var olduğu bulunmuştur. Ayrıca, MMR'de görev alan proteinlerin ekspresyonlarının oksidatif stres varlığında geçici olarak baskılandığı, kronik *Helicobacter pylori* infeksiyonunun neden olduğu oksidatif stresin de mikrosatellit instabilitesi pozitif gastrik kanser gelişimine neden olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda mikrosatellit instabilitesi olmayan tümörlerde *Helicobacter pylori*'nin yaygın olmadığı, mikrosatellit instabilitesi pozitif tümörlerde *Helicobacter pylori* suşlarının daha virülan olduğu ve *Helicobacter pylori*'nin

dirençli suşlarıyla infekte bireylerin mikrosatellit instabilitesi gelişimine daha yatkın olduğu belirtilmiştir [50].

Park ve ark. (2005)'nin yaptıkları bir çalışmada kronik *Helicobacter pylori* enfeksiyonu olan hastalarda ekspresyonlarının düşük olduğu durumlarda mikrosatellit instabilitesine yol açtığı bilinen hMLH1 ve hMLH2 proteinlerinin düzeyleri *Helicobacter pylori* ile infekte gastrit ve peptik ülserli 60 hastadan alınan biopsi örneklerinde immünohistokimyasal tekniklerle hastalığın eredikasyon öncesi ve sonrası olmak üzere karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. *Helicobacter pylori* eredikasyonu sonrasında bu proteinlerin ekspresyonlarının anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir [51]. Kim ve ark. (2002)'nin yaptıkları bir çalışmada ise, *Helicobacter pylori* ve *Helicobacter pylori* virülans faktörlerinin MMR proteinleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada çeşitli hücre serilerinde hücre-bakteri kokültürleri yapılarak ve ayrıca *Helicobacter pylori*'den elde edilen bakteri CagA virülans faktörüyle hücre hatları inkübe edilerek, MMR proteinlerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Çalışmada, *Helicobacter pylori* CagA virülans faktörünün de etkisinin araştırılması amacıyla CagA pozitif ve CagA negatif olmak üzere 2 farklı bakteri zinciri kullanılmıştır. AGS, KATO-3, NCL-N87, SNU, HCT-116 ve HeLa hücre serileri 4, 12, 24 ve 48 saatlik sürelerde *Helicobacter pylori* suşları (CagA pozitif ve CagA negatif) ile inkübe edilirken, bakteri süspansiyonlarından elde edilen bakteri fraksiyonları da yine aynı hücre serileri ile 24 saat inkübe edilmiştir. Yapılan Western blot, RNA mikroarray hibridizasyonu, PCR ve immünohistokimyasal boyamalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, *Helicobacter pylori* ile kokültürü yapılan hücrelerde MMR proteinlerinde önemli düzeyde azalma olduğu, bakterinin başlıca hMHS2 ve hMLH1 proteinlerini etkilediği ve diğer proteinlerdeki azalmanın ikincil olarak geliştiği tespit edilmiştir. Bakteri fraksiyonları ile yapılan çalışmalarda da aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle, *Helicobacter pylori*'nin MMR proteinleri üzerindeki etkisinin bakteriyel ürünler aracılığı ile olduğu, doğrudan bakteriye temasın gerekmediği, öte yandan CagA pozitif ve CagA negatif zincirleri arasında MMR proteinleri açısından fark olmadığından dolayı CagA virülans faktörünün bu etkiye yol açmadığı, ancak *Helicobacter pylori* hücre duvarı yapısında bulunan liposakkaritlerin bu etkiye yol açabileceği ifade edilmiştir [24].

Helicobacter pylori'nin MMR onarımı üzerine yapılan bir başka çalışmada ise, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun AGS hücre serisinde, C57BL/6 farelerinde ve kronik gastritli hastalardan alınan biopsi örneklerinde olası genotoksik etkileri PCR, Western blot ve SDS-Page gibi moleküler metotlarla değerlendirilmiştir. AGS hücreleri, MOI100 uygulanarak *Helicobacter pylori* suşu ile 24 saat ve MOI10 dozunda *Helicobacter pylori* uygulanarak 5 gün boyunca inkübe edilirken; C57BL/6 fareleri 10^6 cfu/mL olacak şekilde 3 hafta, 6 hafta ve 12 haftalık süre boyunca infekte edilmiştir. Ayrıca 99 hastadan alınan *Helicobacter pylori* pozitif gastrit biopsi örneği de değerlendirilmiştir. Yapılan MMR gen ekspresyonu değerlendirilmelerinde, AGS hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonun sonunda kontrol grubuna göre MMR proteinlerinin mRNA düzeylerinde (özellikle MSH1 ve hMSH6) bir miktar düşüş meydana gelirken, bu

düşüşün 5 gün boyunca inkübe edilen hücrelerde daha belirgin olduğu bulunmuştur. C57BL/6 farelerinde MMR'de görev alan genlerin ekspresyonlarında infeksiyon sonrası 3. haftada kontrol grubuna göre azalma tespit edilirken, 12 hafta boyunca infekte edilen grupta herhangi azalma tespit edilmemiştir [45].

Helicobacter pylori virülans faktörleri ve neden olduğu DSB arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla Toller ve ark. (2011)'nin yaptıkları *in vitro* çalışmada *Helicobacter pylori*'nin BabA adhezyon virülans faktörüne bağlı olarak DSB'leri arttırdığı görülmüştür. Bu çalışmada *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile oluşan DNA hasarının ATM bağımlı 53BP1 ve MDC1 oluşumlarında ve H2Ax fosforilasyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir [9]. Hanada ve ark. (2014)'nin yaptıkları *in vivo* bir çalışma ise DSB'nin biyogöstergeleri olan ATM ve γ -H2AX'in *Helicobacter pylori* ile infekte olan hastalardan alınan gastrik biopsi örneklerinde anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuş ve *Helicobacter pylori* infeksiyonunun neden olduğu DNA DSB oluşumuna bir cevap olarak artan ATM indüksiyonunun kromozom aberasyonlarını önlemekte ya da azaltmakta etkili olduğu düşünülmüştür [10].

p21ras birçok büyüme faktörü tarafından aktive edilebilen ve sinyal iletim yollarında rol alan GTPaz yapısında küçük bir onkoproteindir ve pek çok kanserin patogeneziinde rol oynar. *Helicobacter pylori* ile bağlantılı kronik gastritin kansere dönüşümünde görülen KRAS mutasyonlarında etki olduğu düşünülmektedir. Hiyama ve ark. (2002) 64 *Helicobacter pylori* pozitif kronik gastrit, 99 adet gastrik kanserli *Helicobacter pylori* negatif ancak kronik gastritli ve gastrik kanserli hastadan ve 30 sağlıklı gönüllü den aldıkları gastrik biopsi örnekleri ile yapılan çalışmada tüm gastrik kanserli hastaların %10'unda; ayrıca *Helicobacter pylori* pozitif gastrit kanserli hastaların %48'inde KRAS mutasyonu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sonuçta gastrik kanser gelişiminde *Helicobacter pylori*'nin KRAS mutasyonlarına neden olan etkili bir faktör olabileceğini öne sürmüşlerdir [52].

Oldukça yaygın mutasyon tipi olan CpG nükleotidlerindeki GC→AT tranversiyonu diyetle alınan N-nitrozaminlerden veya gastrik asidik ortamdaki nitratlardan kaynaklanabileceği gibi, *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu akut ve kronik inflamasyondan da kaynaklanabilir. Bu mutasyon CpG dinükleotidlerindeki 5-metilsitozinin deaminasyonunun sitozinin timine dönüşümüne neden olduğu bilinmektedir [51]. *Helicobacter pylori* kaynaklı GC→AT tranversiyonun özellikle p53 ve KRAS genlerinde yaygın olduğu bildirilmiştir [51, 53, 54]. Bu mutasyonlarda kronik inflamasyonun yanı sıra *Helicobacter pylori* virülans faktörleri de önemli etkiye sahiptir. Gastrik mukozada ciddi inflamasyona neden olan ve karsinogenez gelişimini tetikleyen CagA pozitif *Helicobacter pylori* suşlarının, CagA negatif suşlara göre yaklaşık 3,7 kat daha fazla p53 geninde mutasyonlara yol açtığı ve bu mutasyonların çoğunlukla insersiyon/delesyon ve GC→AT tranversiyonu şeklinde görüldüğü gösterilmiştir [53-55]. Transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalarda *Helicobacter pylori* infeksiyonunun %72 oranında baz yanlış eşleşmeleri ve %28 oranında da kalıp kayması mutasyonlarına neden olduğu gösterilmiştir. Touati

ve ark.'nın (2003) yaptığı bir çalışmada *Helicobacter pylori* ile infekte edilen transgenik C57BL6 fareler 6 ve 12 hafta boyunca aynı zamanda yüksek tuzlu/az tuzlu beslenme gruplarına da ayrılmış; bu sürelerin sonunda dekapite edilerek elde edilen örnekler immünohistokimyasal yöntemler ve PCR ile incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda *Helicobacter pylori* pozitif grupta makrofaj ve monositlerde indüklenabilir Nitrik oksit sentaz (iNOS) üretiminde önemli derecede artış görülmüştür. Tam zamanlı PCR (RT-PCR) ile yapılan analizlerde İNOS mRNA ekspresyonunda tuzlu diyetle beslenen nonenfekte kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat artış tespit edilmiştir. Mutasyon tiplerinin incelenmesi amacıyla mideden elde edilen cII transgenleri PCR ile incelenmiş ve 6 haftalık infeksiyon sonrasında *Helicobacter pylori* pozitif grupta kontrol grubuna göre 5 kat daha yüksek oranda mutasyon meydana geldiği; GC→ TA, AT→ CG ve AT→ TA transversiyonlarının çoğunlukta olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, 12 haftalık infeksiyon sonucunda oluşan mutasyon oranı daha düşük olarak tespit edilmiş; bu durumun gastrik epitelyal sistemindeki hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki denge sisteminden kaynaklanabileceği ve hasara uğrayarak apoptoza giden hücrelerin yerine hücre çoğalmasıyla oluşan yeni hücrelerden dolayı uzun süreli maruziyetteki mutasyon oranının düştüğü öne sürülmüştür [56].

Mitokondrial DNA (mtDNA)'da meydana gelen somatik mutasyonlar pek çok kanser tipinin gelişimiyle yakından bağlantılı olup, *Helicobacter pylori* kaynaklı gastrik kanserlerin gelişiminde de etkili olduğu bildirilmiştir. mtDNA'nın kompleks yeniden düzenlemeleri ve tek baz eşleşmeleri birtakım sporadik ve maternal genetik dejeneratif hastalıklarla ilgili olup pek çok dokuya etki etmektedir. mtDNA'da meydana gelen mutasyonların çekirdek DNA'sından 10 kat fazla olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra, yüksek ROT seviyelerinin mtDNA onarım sistemini çekirdek DNA onarım yollarına göre daha az oranda etkilediği bildirilmiştir. *Helicobacter pylori*'nin çekirdek DNA'sına ek olarak mitokondrial DNA'da da genotoksik etki gösterdiğine dair pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda *Helicobacter pylori* infeksiyonunun mtDNA'da mutasyonlara ve mtDNA içeriğinde azalmaya yol açmasına ek olarak, mtDNA onarım mekanizmalarını da zayıflattığını ve özellikle mtDNA'daki D-loop ve elektron transport zincirini kodlayan genlerde mutasyona yol açarak oksidatif fosforilasyonda da zayıflamaya neden olduğu bildirilmiştir [45, 55]. Hiyama ve ark.'nın (2003) yaptıkları bir çalışmada, *Helicobacter pylori*'nin indüklediği gastrik karsinogenez gelişiminde mtDNA'da somatik mutasyonlar meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Helicobacter pylori* pozitif 73 gastrik kanserli hasta ve/veya 75 kronik gastritli hasta ve *Helicobacter pylori* negatif 30 sağlıklı gönülden alınan gastrik biopsi örnekleri mtDNA'da spesifik mononükleotit tekrarı olan D310 mutasyonu mikrosatellit analizleri ile araştırılmıştır. Analizler sonucunda *Helicobacter pylori* pozitif olan gastrik kanserli hastaların %16'sında ve kronik gastritli hastaların %7'sinde mtDNA'da mutasyona rastlanırken, *Helicobacter pylori* negatif kontrollerin hiçbirinde mutasyon tespit edilmemiştir. *Helicobacter pylori* pozitif kronik gastritli ve gastrik kanserli hastalarda mtDNA mutasyonları gastrik

kanseri olmayıp sadece kronik gastriti olan *Helicobacter pylori* pozitif hastalara göre %12 daha yüksek oranda iken *Helicobacter pylori* pozitif gastrik kanserli hastalarının %66'sında mtDNA mutasyonu bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda, *Helicobacter pylori*'nin indüklediği gastrik karsinogenезin erken safhalarında mtDNA mutasyonlarının etkin rol oynayabileceği ifade edilmiştir [51].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar birçok bakteri türünün kronik infeksiyon ya da ürettikleri toksinler yoluyla hücre siklusunun bozulmasına yol açtıkları bilinmektedir. Bakterilerin virülans faktörleri karsinojenik kimyasallara benzer şekilde hücre siklusunda bozulmaya, hücre büyümesinde ve apoptozun gelişiminde değişimlere ve farklı tiplerde DNA hasarlarına neden olabilirler. Kronik inflamasyonun etkilerine ek olarak patojen ajanların salgıladıkları genotoksik virülen faktörleri ve onkoproteinler aracılığı ile de konakçının hücre genomunda mutasyona neden olabildikleri ve bu proteinlerin aynı zamanda DNA onarım mekanizmalarında da değişimlere yol açabildikleri bilinmektedir [5].

Dünya genelinde en yaygın infeksiyon hastalıklarından biri olan ve dünya popülasyonunun yaklaşık %40-50'sinin infekte olduğu *Helicobacter pylori*'nin gastrik kanser ve MALT lenfomaya neden olduğuna dair kesin bulgular olup, IARC tarafından grup I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır [4, 7].

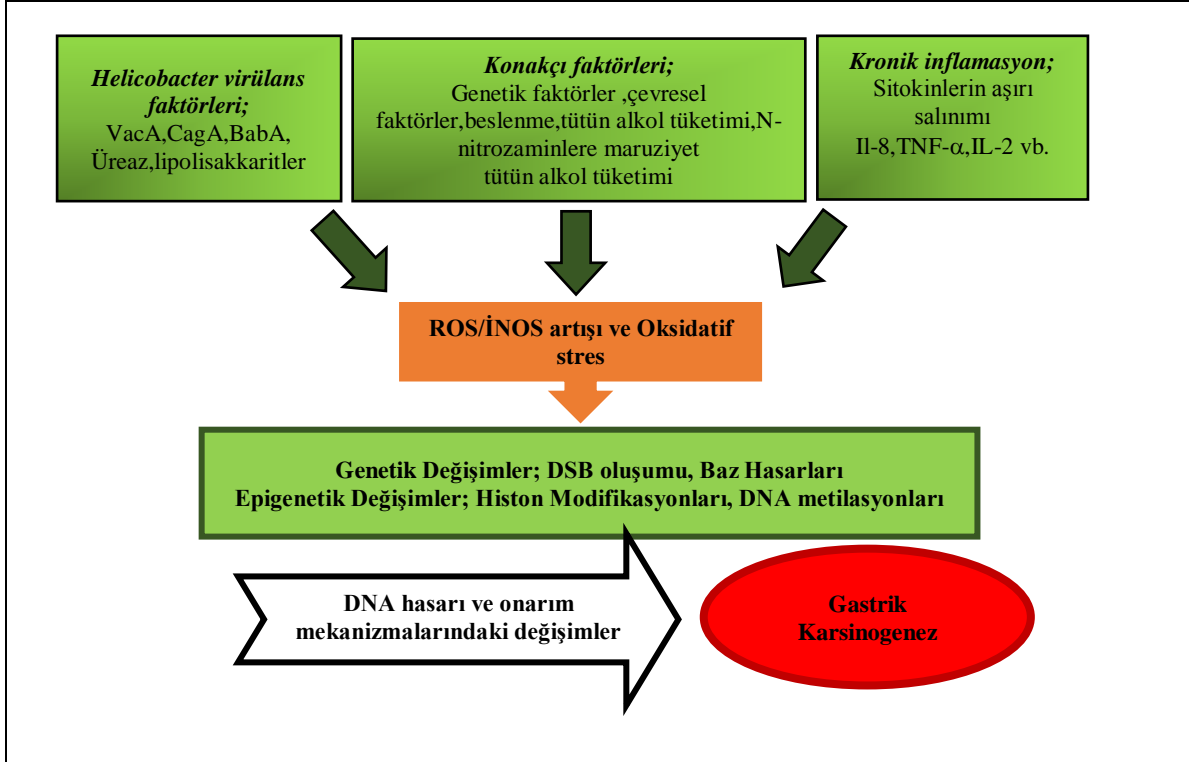
Helicobacter pylori'nin neden olduğu karsinogenез, epigenetik ve genetik mekanizmaların bir arada işlediği kompleks bir süreç olup son yıllarda bu konu ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır. *Helicobacter pylori* kronik infeksiyonunun ROT /RAT'ın oluşumunu indükleyerek gastrik kanser gelişimine neden olan oksidatif/nitrozatif DNA hasarı oluşumunda etkin rol oynadığı bildirilmiştir. Gastrik inflamasyon şiddetinin, konakçının genetik özellikleri, immün yanıtı, diyeti ve pekçok çevresel faktörlerle değişebildiği bilinmektedir. Ayrıca, bakteriye özgü faktörlerin de gastrik kanser gelişimde etkili olduğu düşünülmektedir. *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörlerinden ve ROT oluşumundan bağımsız olarak da genotoksik etkiye neden olduğuna dair bulgular da mevcuttur. *In vitro* ve *in vivo* birçok çalışmadan elde edilen veriler, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA hasarına ve mutasyona yol açtığını göstermiştir; bakterinin bunlara ek olarak DNA onarımını da inhibe ettiğine dair çalışmalar mevcuttur [18, 25, 32, 47, 54].

Gastrik kanserlerde DNA aberan metilasyonu çok sık görülmekte olup, *Helicobacter pylori* kronik inflamasyonunun gastrik epitelyal hücrelerde aberan metilasyona yol açtığı bilinmektedir. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma sonucunda *Helicobacter pylori* infeksiyonunun gastrik karsinogenез gelişimine neden olabilen gen promotör hipermetilasyonlarını ve belirli spesifik gen metilasyonlarını indüklediği ve aynı zamanda *Helicobacter pylori* infeksiyonu düzeylerinin DNA metilasyon düzeyleri ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir [20, 25, 32, 54]. Örneğin; IM'li, primer ya da metastatik

kanserli hatta metaplazisi ya da displazisi olmayan ancak *Helicobacter pylori* pozitif olan hastalarda E-cadherin metilasyonunun meydana geldiği tespit edilmiş; *Helicobacter pylori* infeksiyonunun NF- κ B ve COX-2 gibi inflamatuvar mediyatörler aracılığıyla transkripsiyonal aktivasyonu indükleyebileceği ifade edilmiştir [28]. Yapılan çalışmalar, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun CpG adacıklarının bölgelerine göre değişen oranlarda metilasyonunu indüklediği ve bunun da gastrik karsinogenезin gelişimine predispozan olduğunu göstermektedir [32]. *Helicobacter pylori*'nin, DNA hasar yanıtında görevli proteinlerin ekspresyonlarını etkilediği ve özellikle transkripsiyon alanları ile bağlantılı olan kromozom bölgelerinde DNA hasarlarının lokalize olarak birikime yol açtığı ve ek olarak DNA onarım kapasitesinde de azalmaya neden düşünülmektedir [25]. *Helicobacter pylori* infeksiyonu kaynaklı ROT'un indüklediği başlıca DNA modifikasyonlarından biri de 8-OHdG birikimi olup, ROT oluşumu ile gastrit, gastrik atrofi ve IM arasında güçlü korelasyon bulunmaktadır [26].

Helicobacter pylori infeksiyonu, en ciddi DNA hasarı olan DSB'yi de indüklemektedir. Yapılan çalışmalar, *Helicobacter pylori*'nin ATM, ATR ve CHK2 hücre kontrol noktası proteinlerinin ekspresyonlarını etkilediğini; γ H2AX birikimini tetiklediğini ve bu etkilerle gastrik karsinogenез gelişiminde en önemli etkenlerin başında yer alan genetik instabilite ve kromozomal aberasyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, γ -H2Ax'in epitelyal hücrelerin nükleusunda biriktiği ve bu birikimin kronik gastritten gastrik kanserlere dek artan bir şekilde devam ettiği tespit edilmiştir. Oldukça yaygın mutasyon tipi olan CpG nükleotidlerindeki GC \rightarrow AT tranversiyonu, CpG dinükleotidlerindeki 5-metilsitozinin deaminasyonunun sitozinin timine dönüşümünden kaynaklanmaktadır. *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu GC \rightarrow AT tranversiyonun özellikle p53 ve Kras genlerinde yaygın olduğu düşünülmektedir. Bu mutasyonlarda kronik inflamasyonun yanı sıra *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörlerinin de önemli etkilere sahip oldukları ve de özellikle CagA'nın bu tip etkilerinin olabilceği belirtilmiştir [26, 47].

Sonuç olarak, *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu karsinogenезin gelişiminde kronik inflamasyonun neden olduğu oksidatif stres, bakteriyel virülans faktörleri, konakçıya bağlı intrinsik ve ekstrinsik faktörlerin bir bütün olarak tetiklediği birçok farklı mekanizma rol oynamaktadır (Şekil 4). Ancak, bu tüm mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olup, daha fazla *in vivo* ve *in vitro* mekanistik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.



Şekil 4. *Helicobacter pylori*'nin yol açtığı gastrik karsinogenez gelişiminde etkili olan tüm mekanizmalar [7, 12, 19].

KAYNAKLAR

1. Nardone, G., Compare, D., De Colibus, P., de Nucci, G., Rocco, A. (2007). *Helicobacter pylori* and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis. *Digestive Diseases*, 25(3), 225-229.
2. Nakajima, T., Maekita, T., Oda, I., Gotoda, T., Yamamoto, S., Umemura, S., Ichinose, M., Sugimura, T., Ushijima, T., Saito, D. (2006). Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers. *Cancer, Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(11), 2317-2321.
3. Chiba, T., Marusawa, H., Ushijima, T. (2012). Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroenterology*, 143(3), 550-563.
4. Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S., Ma, N. (2006). Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biological Chemistry*, 387(4), 365-372.
5. Mager, D.L. (2006). Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *Journal of Translational Medicine*, 28, 4, 14.
6. Weitzman, M.D., Weitzman, J.B. (2014). What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell Host & Microbe*, 15(3), 283-294.
7. Correa, P. (2003). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12(3), 238s-241s.

8. Nishizawa, T., Suzuki, H. (2015). Gastric Carcinogenesis and Underlying Molecular Mechanisms: *Helicobacter pylori* and Novel Targeted Therapy. *Biomedical Research International*, 2015, 794378.
9. Ladeira, M.S., Bueno, R.C., Dos Santos, B.F., Pinto, C.L., Prado, R.P., Silveira, M.G., Rodrigues, M.A., Bartchewsky, W. Jr., Pedrazzoli, J. Jr., Ribeiro, M.L., Salvadori, D.M. (2008). Relationship among oxidative DNA damage, gastric mucosal density and therelevance of *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori*. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(1), 248-255.
10. Toller, I.M., Neelsen, K.J., Steger, M., Hartung, M.L., Hottiger, M.O., Stucki, M., Kalali, B., Gerhard, M., Sartori, A.A., Lopes, M., Müller, A. (2011). Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*. 108(36), 14944-14949.
11. Neelapu, N.R.R., Nammi, D., Pasupuleti, A.C.M., Surekka, C. (2014). *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation, ulcer, and cancer: a pathogenesis perspective. *International Journal of Inflammation, Cancer and Integrative Therapy*, 1, 1000113.
12. Blaser, M.J. (1990). *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *Journal of Infectious Diseases*, 161(4), 626-633.
13. Kusters, J.G., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449-490.
14. Burkitt, M.D., Duckworth, C.A., Williams, J.M., Pritchard, D.M. (2017). *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Disease Models & Mechanisms*, 10(2), 89-104.
15. Junaid, M., Linn, A.K., Javadi, M.B., Al-Gubare, S., Ali, N., Katzenmeier, G. (2016). Vacuolating cytotoxin A (VacA) - A multi-talented pore-forming toxin from *Helicobacter pylori*. *Toxicon*, 118:27-35.
16. TC Sağlık Bakanlığı. Türkiye’de ve Dünya’da Kanser Epidemiyolojisi. İnternet Adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/.../kanser...kanser.../>
17. Zhang, X.Y., Zhang, P.Y., Aboul-Soud, MA. (2017). From inflammation to gastric cancer: Role of *Helicobacter pylori*. *Oncology Letters*, 13(2), 543-548.
18. Moss, S.F. (2016). The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3(2), 183-191.
19. Blaser, M.J. (1992). *Helicobacter pylori*: its role in disease. *Clinical Infectious Diseases*, 15(3), 386-391.
20. Arabski, M., Klupinska, G., Chojnacki, J., Kazmierczak, P., Wisniewska-Jarosinska, M, Drzewoski, J., Blasiak, J. (2005). DNA damage and repair in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa cells. *Mutation Research*, 570(1), 129-135.
21. Valenzuela, M.A., Canales, J., Corvalán, A.H., Quest, A.F. (2015). *Helicobacter pylori*-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(45), 12742-12756.

22. Farinati, F., Cardin, R., Degan, P., Rugge, M., Mario, F.D., Bonvicini, P., Naccarato, R. (1998). Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut*, 42(3), 351-356.
23. Crabtree, J.E., Farmery, S.M., Lindley, I.J., Figura, N., Peichl, P., Tompkins, D.S. (1994). CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *Journal of Clinical Pathology*, 47(10), 945-950.
24. Kim, J.J., Tao, H., Carloni, E., Leung, W.K., Graham, D.Y., Sepulveda, A.R. (2002). *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*, 123(2), 542-553.
25. Zarrilli, R., Ricci, V., Romano, M. (1999). Molecular response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*-induced cell damage. *Cellular Microbiology*, 1(2), 93-99.
26. Xie, Y., Zhou, J.J., Zhao, Y., Zhang, T., Mei, L.Z. (2017). *H.pylori* modifies methylation of global genomic DNA and the gastrin gene promoter in gastric mucosal cells and gastric cancer cells. *Microbiology and Pathology*, 108, 129-136.
27. Huang, H., Tian, J., Xu, X., Liang, Q., Huang, X., Lu, J., Yao, Y. (2018). A study on the roles of *Helicobacter pylori* in bile reflux gastritis and gastric cancer. *Jornal of BUON*, 23(3), 659-664.
28. Ushijima, T., Nakajima, T., Maekita, T. (2006). DNA methylation as a marker for the past and future. *Journal of Gastroenterology*, 41(5), 401-407.
29. Chan, A.O., Lam, S.K., Wong, B.C., Wong, W.M., Yuen, M.F., Yeung, Y.H., Hui, W.M., Rashid, A., Kwong, Y.L. (2003). Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut*, 52(4), 502-506.
30. Chan, A.O., Wong, B.C., Lan, H.Y., Loke, S.L., Chan, W.K., Hui, W.M., Yuen, Y.H., Ng, I., Hou, L., Wong, W.M., Yuen, M.F., Luk, J.M., Lam, SK. (2003). Deregulation of E-cadherin-catenin complex in precancerous lesions of gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterology and Hepatology*, 18(5), 534-539.
31. Maeda, M., Moro, H., Ushijima, T. (2017). Mechanisms for the induction of gastric cancer by *Helicobacter pylori* infection: aberrant DNA methylation pathway. *Gastric Cancer*, 20 (Suppl 1), 8-15.
32. Maekita, T., Nakazawa, K., Mihara, M., Nakajima, T., Yanaoka, K., Iguchi, M., Arii, K., Kaneda, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Tamura, G., Saito, D., Sugimura, T., Ichinose, M., Ushijima, T. (2006). High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clinical Cancer Research*, 12, 989-995.
33. Huang, K.K., Ramnarayanan, K., Zhu, F., Srivastava, S., Xu, C., Tan, A.L.K., Lee, M., Tay, S., Das, K., Xing, M., Fatehullah, A., Alkaff, S.M.F., Lim, T.K.H., Lee, J., Ho, K.Y., Rozen, S.G., Teh, B.T., Barker, N., Chia, C.K., Khor, C., Ooi, C.J., Fock, K.M., So, J., Lim, W.C., Ling, K.L., Ang, T.L., Wong, A., Rao, J., Rajnakova, A., Lim, L.G., Yap, W.M., Teh, M., Yeoh, K.G., Tan, P. (2018). Genomic and Epigenomic Profiling of High-Risk Intestinal Metaplasia Reveals Molecular Determinants of Progression to Gastric Cancer. *Cancer Cell*. 33(1), 137-150.
34. Yao, Y., Tao, H., Park, D.I., Sepulveda, J.L., Sepulveda, A.R. (2006). Demonstration and characterization of mutations induced by *Helicobacter pylori* organisms in gastric epithelial cells. *Helicobacter*, 11(4), 272-286.

35. Niwa, T., Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mori, A., Tanaka, H., Maekita, T., Ichinose, M., Tatematsu, M., Ushijima, T. (2010). Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Research*, 70(4), 1430-1440.
36. Zhang, Y., Liu, H., Zhou, K. (2001). Lack of correlation of *vacA* genotype, *cagA* gene of *Helicobacter pylori* and their expression products with various gastroduodenal diseases. *China Medical Journal*, 114(7), 703-706.
37. Xia, G., Schneider-Stock, R., Diestel, A., Habold, C., Krueger, S., Roessner, A., Naumann, M., Lendeckel, U. (2008). *Helicobacter pylori* regulates p21(WAF1) by histone H4 acetylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(2), 526-531.
38. Fehri, L.F., Rechner, C., Janssen, S., Mak, T.N., Holland, C., Bartfeld, S., Brüggemann, H., Meyer, T.F. (2009). *Helicobacter pylori*-induced modification of the histone H3 phosphorylation status in gastric epithelial cells reflects its impact on cell cycle regulation. *Epigenetics*, 4(8), 577-586.
39. Ding, S.Z., Goldberg, J.B., Hatakeyama, M. (2010). *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future Oncology*, 6(5):851-862.
40. Santos, J.C., Gambeloni, R.Z., Roque, A.T., Oeck, S., Ribeiro, ML. (2018). Epigenetic Mechanisms of ATM Activation after *Helicobacter pylori* Infection. *American Journal of Pathology*, 188(2), 329-335.
41. Jang, S.H., Lim, J.W., Morio, T, Kim H. (2012). Lycopene inhibits *Helicobacter pylori*-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(3), 607-615.
42. Hanada, K., Graham, D.Y. (2014). *Helicobacter pylori* and the molecular pathogenesis of intestinal-type gastric carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 14(8), 947-954.
43. Hanada, K., Uchida, T., Tsukamoto, Y., Watada, M., Yamaguchi, N., Yamamoto, K., Shiota, S., Moriyama, M., Graham, D.Y., Yamaoka, Y. (2014). *Helicobacter pylori* infection introduces DNA double-strand breaks in host cells. *Infection and Immunity*, 82(10), 4182-4189.
44. Xie, C., Xu, L.Y., Yang, Z., Cao, X.M., Li, W., Lu, N.H. (2014). Expression of γ H2AX in various gastric pathologies and its association with *Helicobacter pylori* infection. *Oncology Letters*, 7(1), 159-163.
45. Koepfel, M., Garcia-Alcalde, F., Glowinski, F., Schlaermann, P., Meyer, T.F. (2015). *Helicobacter pylori* Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells. *Cellular Reproduction*, 11(11), 1703-1713.
46. Machado, A.M., Figueiredo, C., Touati, E., Máximo, V., Sousa, S, Michel, V., Carneiro, F., Nielsen, F.C., Seruca, R., Rasmussen, L.J. (2009). *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clinical Cancer Research*, 15(9), 2995-3002.
47. Machado, A.M., Desler, C., Bøggild, S., Strickertsson, J.A., Friis-Hansen, L., Figueiredo, C., Seruca, R., Rasmussen, L.J. (2013). *Helicobacter pylori* infection affects mitochondrial function and DNA repair, thus, mediating genetic instability in gastric cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(10), 460-6.

48. Ding, S.Z., Fischer, W., Kaparakis-Liaskos, M., Liechti, G., Merrell, D.S., Grant, P.A., Ferrero, R.L., Crowe, S.E., Haas, R., Hatakeyama, M., Goldberg, J.B. (2010). Helicobacter pylori-induced histone modification, associated gene expression in gastric epithelial cells, and its implication in pathogenesis. PLoS One, 5(4), e9875.
49. Futagami, S., Hiratsuka, T., Shindo, T., Horie, A., Hamamoto, T., Suzuki, K., Kusunoki, M., Miyake, K., Gudis, K., Crowe, S.E., Tsukui, T., Sakamoto, C. (2008). Expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease-1 (APE-1) in H. pylori-associated gastritis, gastric adenoma, and gastric cancer. Helicobacter, 13(3), 209-218.
50. Leung, W.K., Kim, J.J., Kim, J.G., Graham, D.Y., Sepulveda, A.R. (2000). Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. American Journal of Pathology, 156(2), 537-543.
51. Park, D.I., Park, S.H., Kim, S.H., Kim, J.W., Cho, Y.K., Kim, H.J., Sohn, C.I., Jeon, W.K., Kim, B.I., Cho, E.Y., Kim, E.J., Chae, S.W., Sohn, J.H., Sung, I.K., Sepulveda, A.R., Kim, J.J. (2005). Effect of Helicobacter pylori infection on the expression of DNA mismatch repair protein. Helicobacter, 10(3), 179-184.
52. Hiyama, T., Haruma, K., Kitadai, Y., Masuda, H., Miyamoto, M., Tanaka, S., Yoshihara, M., Shimamoto, F., Chayama, K. (2002). K-ras mutation in Helicobacter pylori-associated chronic gastritis in patients with and without gastric cancer. International Journal of Cancer, 97(5), 562-566.
53. Sawa, T., Ohshima, H. (2006). Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. Nitric Oxide, 14(2), 91-100.
54. Shibata, A., Parsonnet, J., Longacre, T.A., Garcia, M.I., Puligandla, B., Davis, R.E., Vogelstein, J.H., Orentreich, N., Habel, L.A. (2002). CagA status of Helicobacter pylori infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. Carcinogenesis, 23(3), 419-424.
55. Touati, E. (2010). When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from H.pylori. Mutation Research, 703(1), 66-70.
56. Morgan, C., Jenkins, G.J., Ashton, T., Griffiths, A.P., Baxter, J.N., Parry, E.M., Parry, J.M. (2003). Detection of p53 mutations in precancerous gastric tissue. British Journal of Cancer, 89(7), 1314-1319.